

HIV BLOT 2.2

ENSAYO DE TRANSFERENCIA WESTERN PARA VIH

CE
0123

FECHA DE REVISIÓN: 05/05
MAE 0011-SPN-0

Nota: Cambios resaltados.

REF (kit de 18 análisis): 11030-018
(kit de 36 análisis): 11030-036

NOMBRE Y USO PREVISTO

El ensayo **HIV BLOT 2.2 de MP Diagnostics (MPD)** es un enzimoinmunoensayo cualitativo para la detección *in vitro* de anticuerpos frente a los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) en suero o plasma humanos. Su uso previsto es como análisis complementario más específico para muestras de suero o plasma humanos que presentan reactividad repetida utilizando procedimientos de detección selectiva como el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).

INTRODUCCIÓN

Existe actualmente una amplia disponibilidad de análisis de detección selectiva para determinar la presencia de anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2, los agentes causales del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Dichos análisis pueden ser muy sensibles, pero existe la posibilidad de que sean menos específicos, con lo que pueden dar lugar a falsos positivos. Ello explica la necesidad de disponer de análisis complementarios independientes de elevada especificidad para confirmar la presencia de anticuerpos frente al VIH-1, el VIH-2 o ambos.

Los kits **HIV BLOT 2.2 de MP Diagnostics** se diseñaron como análisis complementario más específico para muestras de suero o plasma humanos que presentan reactividad repetida utilizando el ensayo ELISA. Los antígenos víricos específicos separados del VIH-1, que se adhieren a las tiras mediante procedimientos de electroforesis y electrotransferencia, se combinan en la misma tira con un péptido sintético específico del VIH-2, lo cual permite delimitar con mayor exactitud las respuestas de anticuerpos ante proteínas víricas específicas. Cada tira incluye también un control interno de adición de muestras para reducir al mínimo el riesgo de falsos negativos debidos a errores operativos y para garantizar la adición de las muestras.

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

A continuación figuran los signos gráficos que aparecen en los envases y productos de **MP Diagnostics**, y que son los que se incluyen con más frecuencia en los dispositivos médicos y sus envases. Se explican con mayor detalle en la Norma británica y europea BS EN 980:2003.


Usar antes de
Sinónimos:
Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Código de serie
Sinónimos:
Número de lote
Número de serie



Número de catálogo


Límite de temperatura


Atención
Consulte las Instrucciones de uso


Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Contenido suficiente para <n> ensayos



Consultar las instrucciones de uso

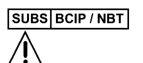

No reutilizar

PRINCIPIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO

Mediante transferencia por electroforesis se adhieren a las tiras de nitrocelulosa proteínas antigénicas ligadas separadas de VIH-1 inactivado y parcialmente purificado, más un péptido sintético específico del VIH-2. Las tiras de nitrocelulosa individuales se incuban con suero o plasma diluidos y controles. Si la muestra contiene anticuerpos específicos frente al VIH-1 y VIH-2, dichos anticuerpos se unirán a las proteínas del VIH-1 y al péptido del VIH-2 de las tiras. A continuación se lavan las tiras para eliminar los productos no ligados. Los anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas del VIH se pueden visualizar mediante una serie de reacciones con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT. La sensibilidad de este método permite detectar en el suero o el plasma cantidades ínfimas de anticuerpos específicos frente al VIH.

COMPONENTES DEL KIT

	Descripción del componente	Cantidad suministrada
ANTIGEN STRIPS	**TIRAS DE NITROCELULOSA** Con lisado de VIH-1, péptido específico de la envoltura del VIH-2 y una banda de control para la adición de suero. Manténgalas secas y alejadas de la luz.	Disponible en 18 ó 36 tiras

CONTROL –	**CONTROL NO REACTIVO** Suero humano normal inactivado, no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y sin anticuerpos frente al VIH-1/2 y VHC. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
CONTROL +	**CONTROL REACTIVO FUERTE** Suero humano inactivado con una concentración elevada de anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2, no reactivo para el HBsAg y sin anticuerpos frente al VHC. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
CONTROL WEAK 	**CONTROL REACTIVO DÉBIL** Suero humano inactivado con una concentración baja de anticuerpos frente al VIH-1 EXCLUSIVAMENTE, no reactivo para el HBsAg y sin anticuerpos frente al VIH-2 y el VHC. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
BUF STOCK 10x	**TAMPÓN DE BLOTTING CONCENTRADO (10x)** Tampón Tris con suero de cabra normal termoinactivado. Contiene timerosal como conservante.	1 frasco (20 ml)
BUF WASH 20x	**TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO (20x)** Tris con Tween-20. Contiene timerosal como conservante.	1 frasco (70 ml)
CONJUGATE	**CONJUGADO** Anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina. Contiene azida sódica como conservante.	1 vial (120 µl)
SUBS BCIP / NBT 	**SUSTRATO** Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT).	1 frasco (100 ml)
POWDER BLOTTING	**POLVO DE BLOTTING** Leche desnatada	10 paquetes (1 g cada uno)
	Bandeja de incubación de 9 pocillos	2 ó 4 bandejas
	Manual de instrucciones	1 copia
	Pinzas	1 par

Nota: se suministra un volumen de reactivos suficiente para 4 series de análisis.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* únicamente.
2. Para uso exclusivo por profesionales.
3. Consulte el prospecto del producto para obtener información sobre los componentes potencialmente peligrosos.

INFORMACIÓN SANITARIA Y DE SEGURIDAD



PRECAUCIONES: Este kit contiene productos de origen humano. Ningún método de análisis permite ofrecer una garantía absoluta de que los hemoderivados humanos no transmitan una infección.

MANIPULE LAS MUESTRAS, LOS CONTROLES REACTIVOS FUERTES Y DÉBILES Y LOS CONTROLES NO REACTIVOS COMO SI FUERAN POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Se recomienda manipular los componentes del ensayo y las muestras de conformidad con las prácticas correctas de laboratorio. Asimismo, deben desecharse siguiendo los procedimientos de seguridad establecidos.

El ***control reactivo fuerte, el control reactivo débil*** y el ***control no reactivo*** contienen timerosal y azida sódica; el tampón de blotting concentrado y el tampón de lavado concentrado contienen timerosal; el conjugado contiene azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el cobre y el plomo que se utilizan en ciertas tuberías y formar sales explosivas. Aunque las cantidades que se usan en este kit son pequeñas, los materiales que contienen azida deben eliminarse con volúmenes relativamente grandes de agua para evitar la acumulación de azidas metálicas en las tuberías. A continuación figuran las frases relativas a los riesgos (R) correspondientes.

R22 Nocivo por ingestión.

El ***sustrato*** contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y nitroazul de tetrazolio, clasificados como nocivos (Xn) por las directivas de la Comunidad Económica Europea (CEE) que son de aplicación. A continuación figuran las frases relativas a los riesgos (R) correspondientes.

R20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

1. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales.
2. No pipetee con la boca.
3. Manipule las muestras, las tiras de nitrocelulosa, el reactivo, los controles reactivos fuerte y débil y los controles no reactivos como si fueran potencialmente infecciosos.
4. Use bata de laboratorio y guantes desechables mientras realiza el ensayo. Deseche los guantes en bolsas para residuos biopeligrosos. Lávese bien las manos al finalizar.
5. Es muy recomendable que este ensayo se lleve a cabo en una cámara de bioseguridad.
6. Mantenga el material alejado de bebidas y alimentos.
7. En caso de accidente o contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
8. Acúdase a un médico de inmediato si se ingiere material contaminado o si éste entra en contacto con heridas abiertas u otras lesiones de la piel.

9. Limpie de inmediato los vertidos de material potencialmente peligroso con un papel absorbente y lave la zona contaminada con una solución de hipoclorito sódico al 1% antes de reanudar el trabajo. El hipoclorito sódico no debe utilizarse para vertidos que contengan ácido, a menos que se seque la zona previamente con un papel absorbente. Para su eliminación, el material utilizado (incluidos los guantes desechables) debe tratarse como material potencialmente biopeligroso. No utilice el autoclave para el material que contenga hipoclorito sódico.
10. Esterilice en autoclave todos los materiales usados y contaminados a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos antes de desecharlos. Otra opción consiste en descontaminar los materiales con una solución de hipoclorito sódico al 5% durante 30-60 minutos antes de desecharlos en una bolsa para residuos biopeligrosos.
11. Descontamine todos los productos químicos y reactivos usados añadiéndoles un volumen de hipoclorito sódico suficiente como para conseguir una concentración final de al menos el 1%. Déjelos en reposo durante 30 minutos para lograr una descontaminación eficaz.
12. No recomendamos la reutilización de las bandejas de incubación.

PRECAUCIONES ANALÍTICAS

1. Para obtener un rendimiento óptimo del ensayo es necesario un **CUMPLIMIENTO ESTRICTO** del procedimiento descrito en el presente Manual de instrucciones. Cualquier modificación del procedimiento puede provocar resultados anómalos.
2. **NO CAMBIE NI SUSTITUYA LOS REACTIVOS DE UN LOTE DEL KIT POR LOS DE OTRO.** Los controles, el conjugado y las tiras de Western blot están ajustados para un funcionamiento óptimo. Use sólo los reactivos que se suministran con el kit.
3. No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad que figura en la caja.
4. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales, ya que ello reduciría de forma prematura el periodo de validez de los kits y daría lugar a resultados erróneos. Al extraer partes alícuotas de los viales utilice técnicas asépticas, como pipetas o puntas de pipeta desechables.
5. Los controles del kit deben analizarse al mismo tiempo que las muestras clínicas en cada serie de análisis.
6. Para evitar la contaminación cruzada, use una punta de pipeta nueva para cada alícuota de la muestra.
7. Para obtener resultados óptimos, dispense todos los reactivos mientras todavía estén fríos y vuélvalos a guardar a 2 °C - 8 °C lo antes posible.
8. Se aconseja lavar el material de vidrio que se vaya a utilizar para los reactivos con ácido clorhídrico 2 M y aclararlo bien con agua destilada o desionizada antes de usarlo.
9. Utilice sólo agua destilada o desionizada de calidad reactivo para diluir los reactivos.
10. Todos los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso.
11. La solución del conjugado de trabajo, el tampón de lavado diluido y el tampón de transferencia **deben estar recién preparados.**
12. La solución del conjugado de trabajo debe prepararse en un recipiente o vaso de precipitado de polipropileno.
13. No exponga los reactivos ni realice el análisis en un área en la que exista un nivel elevado de vapores de desinfectantes químicos (p. ej., vapores de hipoclorito) durante las etapas de almacenamiento y de incubación: el contacto inhibe la reacción de color. Los reactivos tampoco deben exponerse a la luz intensa.
14. Es preferible efectuar el ensayo a temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C).
15. Asegúrese de colocar las tiras con los números hacia arriba.
16. En los ensayos de Western blot es importante utilizar un agitador con plato basculante; el uso de un agitador rotativo podría poner en peligro el rendimiento del kit. La velocidad de agitación y el ángulo de inclinación recomendados son, respectivamente, de 12 a 16 ciclos por minuto y de 5 a 10 grados.steps. Contact inhibits colour reaction. Also do not expose reagents to strong light.
17. Si se utiliza equipo automatizado, debe verificarse que haya sido validado antes de su uso.
18. Asegúrese de añadir las muestras sin que toquen la tira. Para ello, puede inclinar la bandeja y añadir la muestra en la parte baja donde se acumula el tampón. De este modo se evitará la formación de puntos negros debidos a la adición de muestra a la tira.
19. No utilice congeladores con función de descongelación automática para conservar los reactivos y las muestras.
20. No recomendamos la utilización de muestras diluidas o liofilizadas, ya que pueden producir falsos resultados. Si forman parte o constituyen la totalidad de un panel de control de calidad, deberán estar validadas.

INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN

1. Conserve el kit HIV BLOT 2.2 de MPD y sus componentes a 2 °C - 8 °C cuando no se estén utilizando.
2. Todos los reactivos y tiras de análisis, si se conservan a 2 °C - 8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad que figura en el kit. No congele los reactivos.

A. **Tiras de antígenos**
- Evite las exposiciones innecesarias de las tiras de antígenos a la luz.

B. **Reactivos**
- Conserve los reactivos en sus viales o frascos originales, que deben permanecer tapados.
- Dispense todos los reactivos cuando aún estén fríos y vuélvalos a guardar a 2 °C - 8 °C lo antes posible.
- Cuando el sustrato se conserva a 2 °C - 8 °C puede precipitar, sin que ello afecte al funcionamiento del kit.

Precaución: **Evite las exposiciones innecesarias del sustrato a la luz.**

RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se pueden utilizar muestras de suero o plasma con EDTA, heparina o citrato sódico. Antes de guardar las muestras, verifique que se hayan separado por centrifugación los coágulos o las células sanguíneas.

Las muestras deben conservarse a 2 °C - 8 °C si el análisis se va a llevar a cabo en los 7 días posteriores a la extracción, o congelarse a una temperatura de al menos -20 °C si el análisis se va a retrasar más de 7 días. Es preferible utilizar muestras transparentes y no hemolizadas. Las muestras lipémicas, ictéricas o contaminadas (por partículas) deben filtrarse (0,45 µm) o centrifugarse antes del análisis.

Las muestras de los pacientes pueden estar inactivadas, pero esto no es un requisito para el rendimiento óptimo del análisis.

Para efectuar la inactivación:
1. Afloje las tapas de los recipientes con la muestra.
2. Caliente la muestra a 56 °C durante 30 minutos al baño María.
3. Deje enfriar la muestra antes de volver a ajustar las tapas.
4. La muestra puede conservarse congelada hasta el análisis.

Se recomienda que la muestra de los pacientes no se someta a ciclos repetidos de congelación y descongelación antes del ensayo.

MATERIAL ADICIONAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Agua destilada o desionizada.
- Guantes desechables.
- Plataforma basculante (con velocidad de balanceo de 12 - 16 oscilaciones por minuto e inclinación de 5° - 10° para lavar las membranas uniformemente).
- Pipetas y puntas del volumen adecuado.
- Aspirador con depósito de hipoclorito sódico.
- Baño María de 56 °C (optativo).
- Hipoclorito sódico para la descontaminación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO
   (a) El TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO debe estar **recién preparado.**
   (b) Diluya 1 volumen de TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO (20X) con 19 volúmenes de agua de calidad reactivo. Mezcle bien.

2. TAMPÓN DE BLOTTING DE TRABAJO
   (a) El TAMPÓN BLOTTING DE TRABAJO debe estar **recién preparado.**
   (b) Diluya 1 volumen de TAMPÓN BLOTTING CONCENTRADO (10X) con 9 volúmenes de agua de calidad reactivo. Mezcle bien.
   (c) Añada 1 g de POLVO DE BLOTTING por cada 20 ml del TAMPÓN DE BLOTTING diluido preparado en la etapa anterior (2 b). Revuelva hasta que el polvo se disuelva por completo.
   (d) Revuelva de nuevo antes de dispensar la mezcla.

3. SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO
   Nota: prepare la solución en un recipiente o vaso de precipitado de polipropileno.
   (a) LA SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO **debe estar recién preparada.**
   (b) Prepare la SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO diluyendo CONJUGADO en TAMPÓN DE TRANSFERENCIA en proporción de 1:1000; p. ej., 5 µl de CONJUGADO en 5 ml de TAMPÓN DE TRANSFERENCIA.

4. SOLUCIÓN SUSTRATO (lista para su uso)
   (a) Dispense el volumen necesario directamente del frasco.
   Use una pipeta limpia. Cierre bien el frasco después de usarlo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO: ENSAYO RÁPIDO

Notas: a) Los usuarios pueden utilizar el análisis rápido o de noche para funcionar las pruebas. Las vendas del VIH son convertidas y más vendas pueden aparecer con el análisis de noche, pero el funcionamiento total de los dos análisis es igual.

b) Aspire todos los productos químicos y reactivos utilizados con un aspirador provisto de depósito con hipoclorito sódico.

c) Todas las incubaciones deben efectuarse en una plataforma basculante.

Precaución:
Algunas muestras pueden causar manchas oscuras en el punto de la tira en el que se añadieron. Para evitar este problema, proceda de la forma siguiente:

i. Añada siempre la muestra después de haber dispensado el TAMPÓN BLOTTING DE TRABAJO.
ii. Incline ligeramente la bandeja elevando su extremo superior o su fondo. El tampón de transferencia se desplazará hacia la zona más baja de la bandeja. Añada la muestra en la zona en la que se haya acumulado el tampón de transferencia. Cuando haya dispensado todas las muestras, devuelva la bandeja a su posición plana inicial. Asegúrese siempre de que las tiras se mantengan húmedas durante el proceso.
iii. Otra opción, si no desea inclinar la bandeja, es dispensar las muestras en el extremo superior o en el fondo del pocillo. De esta forma, si aparecen manchas oscuras, la lectura de los resultados de la tira no se verá afectada.

Procedimiento:

1. Añada 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO a cada pocillo. **2 ml**
2. Utilizando unas pinzas, extraiga con cuidado del tubo la cantidad de TIRAS necesaria y coloque cada tira en su pocillo con el número hacia arriba. Incluya tiras para los controles reactivo fuerte, reactivo débil y no reactivo.
3. Incube las tiras durante 1 ó 2 minutos a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en un plato basculante (velocidad 12-16 ciclos por minuto). Extraiga el tampón por aspiración. **2 minutos**
   (Nota: No permita que las tiras sequen falta puede dar lugar a marcas acuosas en las tiras desarrolladas para algunos especímenes.)
4. Añada 2 ml de tampón BLOTTING DE TRABAJO a cada pocillo. **2 ml**
5. Añada 20 µl de suero de los pacientes o de controles, según corresponda, en cada uno de los pocillos. Debe tomar precauciones para evitar añadir las muestras directamente en las tiras. **20 µl**
6. Cubra la bandeja con la tapa suministrada e incube durante 1 hora a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en la plataforma basculante. **60 minutos**
7. Destape la bandeja con cuidado para evitar salpicaduras y el mezclado de las muestras. Incline la bandeja para aspirar la mezcla de los pocillos. Cambie las puntas del aspirador entre muestras para evitar la contaminación cruzada.

8. Lave 3 veces cada tira con 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO, dejando que se empapen durante 5 minutos en la plataforma basculante entre los lavados.to ensure specimens are not added directly on the strips. **3 x 2 ml**
9. Añada 2 ml de SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO a cada pocillo. **2 ml**
10. Cubra la bandeja e incube durante 1 hora a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en la plataforma basculante. **60 minutos**
11. Aspire el CONJUGADO de los pocillos. Lave como en el paso 8. **3 x 2 ml**
12. Añada 2 ml de SOLUCIÓN SUSTRATO a cada pocillo. **2 ml**
13. Cubra la bandeja e incube durante 15 minutos en la plataforma basculante. (Nota: La reacción se puede parar antes de 15 minutos si todas las vendas son visibles.) **15 minutos**
14. Aspire el SUSTRATO y aclare las tiras un mínimo de tres veces con agua de calidad reactivo para detener la reacción (el lavado insuficiente durante esta etapa puede provocar la aparición de un fondo oscuro). **3 x 2 ml**
15. Utilizando unas pinzas, coloque las tiras con suavidad sobre paños de papel. Cúbralas con los paños de papel y séquelas. Otra posibilidad es dejar que las tiras se sequen en los pocillos de la bandeja.
16. Coloque las tiras en una hoja de trabajo (papel blanco no absorbente). No aplique cinta adhesiva sobre las bandas reveladas. Observe las bandas (véase Interpretación de los resultados) y califique los resultados. Para el almacenamiento, mantenga las tiras en la oscuridad.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO: ENSAYO NOCTURNO

Procedimiento:

1. Añada 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO a cada pocillo. **2 ml**
2. Utilizando unas pinzas, extraiga con cuidado del tubo la cantidad de TIRAS necesaria y coloque cada tira en su pocillo con el número hacia arriba. Incluya tiras para los controles reactivo fuerte, reactivo débil y no reactivo.
3. Incube las tiras durante 1 ó 2 minutos a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en un plato basculante (velocidad 12-16 ciclos por minuto). Extraiga el tampón por aspiración. (Nota: No permita que las tiras sequen falta puede dar lugar a marcas acuosas en las tiras desarrolladas para algunos especímenes.) **2 minutos**
4. Añada 2 ml de TAMPÓN BLOTTING DE TRABAJO a cada pocillo. **2 ml**
5. Añada 20 µl de suero de los pacientes o de controles, según corresponda, en cada uno de los pocillos. **20 µl**
6. Cubra la bandeja con la tapa suministrada e incube durante toda la noche (16 - 20 horas) a temperatura ambiente (25 ±3 °C) en la plataforma basculante. **toda la noche**
7. Destape la bandeja con cuidado para evitar salpicaduras y el mezclado de las muestras. Incline la bandeja para aspirar la mezcla de los pocillos. Cambie las puntas del aspirador entre muestras para evitar la contaminación cruzada.
8. Lave 3 veces cada tira con 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO, dejando que se empapen durante 5 minutos en la plataforma basculante entre los lavados. **3 x 2 ml**
9. Añada 2 ml de SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO a cada pocillo. **2 ml**
10. Cubra la bandeja e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en la plataforma basculante. **30 minutos**
11. Aspire el CONJUGADO de los pocillos. Lave como en el paso 8. **3 x 2 ml**
12. Añada 2 ml de SOLUCIÓN SUSTRATO a cada pocillo. **2 ml**
13. Cubra la bandeja e incube durante 15 minutos en la plataforma basculante. (Nota: La reacción se puede parar antes de 15 minutos si todas las vendas son visibles.) **15 minutos**
14. Aspire el SUSTRATO y aclare las tiras un mínimo de tres veces con agua de calidad reactivo para detener la reacción (el lavado insuficiente durante esta etapa puede provocar la aparición de un fondo oscuro). **3 x 2 ml**
15. Utilizando unas pinzas, coloque las tiras con suavidad sobre paños de papel. Cúbralas con los paños de papel y séquelas. Otra posibilidad es dejar que las tiras se sequen en los pocillos de la bandeja.
16. Coloque las tiras en una hoja de trabajo (papel blanco no absorbente). No aplique cinta adhesiva sobre las bandas reveladas. Observe las bandas (véase Interpretación de los resultados) y califique los resultados. Para el almacenamiento, mantenga las tiras en la oscuridad.

RESUMEN DE LOS PROTOCOLOS DE ENSAYO

Reactivos	Cant.	Temp. amb. Ensayo rápido	Temp. amb. Ensayo nocturno
Tira de nitrocelulosa	1	-	-
Tampón de lavado	2 ml	1-2 min	1-2 min
Tampón blotting de trabajo	2 ml	-	-
Muestra	20 µl	60 min	Toda la noche (16 - 20 horas)
Tampón de lavado	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Conjugado	2 ml	60 min	30 min
Tampón de lavado	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Sustrato (listo para su uso)	2 ml	15 min (o menos)	15 min (o menos)
Agua destilada	3 x 2 ml	-	-

CANTIDADES DE REACTIVOS NECESARIAS PARA DIVERSOS NÚMEROS DE TIRAS							
Reactivos	NÚMERO DE TIRAS A UTILIZAR						
	3	6	9	15	20	27	36
Tampón de lavado 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Tampón blotting de trabajo 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugado (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Sustrato (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Polvo de blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTROL DE CALIDAD

Recomendamos que se analicen en todos los ensayos los controles no reactivo, reactivo fuerte y reactivo débil, independientemente del número de muestras que se analicen. Para que los resultados obtenidos en cualquier ensayo se consideren válidos se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. **CONTROL NO REACTIVO**
   No deben observarse bandas específicas del VIH-1 ni del VIH-2 en las tiras de control no reactivo. La banda del control de suero debe ser visible (Fig. 1c).

2. **CONTROL REACTIVO FUERTE**
   Todas las bandas del peso molecular que corresponda deben ser evidentes. En la Figura 1a se muestra una guía de las posiciones relativas de las bandas visualizadas con el ensayo HIV BLOT 2.2 de MPD que permite identificar las bandas que se observan para el CONTROL REACTIVO FUERTE. Las bandas son p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120/gp160. Pueden ser visibles también otras bandas asociadas a los antígenos centrales [del core] (p39, p42). Tenga cuidado de no interpretarlas erróneamente como gp41. Los antígenos de la envoltura, gp41 y gp120/gp160, aparecen como las bandas difusas típicas de las glucoproteínas. La banda del control de suero debe ser visible. La banda específica del VIH-2 también debe ser visible, tal y como se muestra en la Figura 1a.

3. **CONTROL REACTIVO DÉBIL**
   El control reactivo débil proporciona una medida de la sensibilidad del kit. Deben aparecer bandas débiles en p24 y/o gp41 y en gp120/gp160. Puede haber o no algunas bandas débiles adicionales. La banda del control de suero debe ser visible (Fig. 1b).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

NOTA: para evitar errores en las interpretaciones, las tiras reveladas deben estar completamente secas.

La presencia o ausencia de anticuerpos frente al VIH-1 en la muestra se determina comparando cada tira de nitrocelulosa con las tiras de control del ensayo con los controles NO REACTIVO, REACTIVO FUERTE Y REACTIVO DÉBIL.

La Figura 1a puede servir de ayuda para la identificación de las diversas bandas que aparecen en la tira que se ha hecho reaccionar con el control REACTIVO FUERTE.

TENGA EN CUENTA QUE el extremo numerado de las tiras debe situarse hacia el fondo, tal y como se muestra en la figura; es decir, las bandas gp120/gp160 son las más alejadas del extremo numerado.

PESO MOLECULAR	GEN	ANTÍGENO	DESCRIPCIÓN
gp 160	ENV	Forma polimérica de la gp41	Ancha y difusa de glucoproteína
gp 120	ENV	Membrana externa	Difusa de glucoproteína
p66	POL	Transcriptasa inversa	Banda discreta
p55	GAG	Proteína precursora	Banda discreta
p51	POL	Transcriptasa inversa	Banda discreta justo por debajo de p55
p39	GAG	Fragmento de p55	Banda discreta
gp41	ENV	Transmembrana	Difusa de glucoproteína
p31	POL	Endonucleasa	Doblete
p24	GAG	Proteína central (*core*)	Banda ancha
p17	GAG	Proteína central (*core*)	Banda ancha

Algunos de los antígenos mencionados en la tabla anterior derivan de la misma proteína precursora y pueden tener epítopos superpuestos. Este hecho debe tenerse en cuenta al interpretar el patrón. Por ejemplo:

1. Resulta improbable detectar gp41 si no hay gp160 porque la gp160 es la forma polimérica de la gp41, y en el ensayo HIV BLOT 2.2 de MPD la concentración de gp160 es mayor que la de gp41. La gp41 aparece como una banda difusa. Las bandas nítidas y discretas en la región de la gp41 no deben interpretarse como banda gp41. Muchas muestras normales y no infectadas por el VIH resultan reactivas frente a este antígeno no asociado al VIH, que probablemente tenga su origen en la línea celular humana utilizada para cultivar el virus.

2. La banda p55 se suele detectar cuando existe una reactividad fuerte para el p24 y/o el p17. Las bandas que aparecen como p42 y p39 son fragmentos GAG y no deben interpretarse como gp41 (ENV).

3. Las bandas POL p66, p51 y p31 suelen detectarse de forma simultánea. Sin embargo, la sensibilidad del p66 y del p31 es mayor que la del p51.

4. La reactividad cruzada con el VIH-2 es variable, pero resulta típica la reactividad con antígenos GAG, POL o ambos. Sin embargo, en algunos casos puede haber reactividad cruzada con la banda gp160, pero raramente con la gp41.

5. Existe también una banda de elevado peso molecular (aproximadamente 160 kD) que se cree que es una proteína precursora GAG-POL. Esta banda se observa en ciertos sueros con títulos elevados de VIH-2 o sueros dudosos (reactivos sólo para GAG), pero el patrón de banda es el de una banda nítida y discreta diferente de la banda difusa de la gp160 de ENV.

El proceso de interpretación consta de los siguientes elementos:

1. Verificación de que la banda del control de suero es visible. Si el control es negativo, los resultados deben considerarse no válidos, ya que ello indica un error técnico, como por ejemplo la falta de adición de muestra, de conjugado o de sustrato.
2. Identificación del peso molecular de cada banda de la tira de análisis utilizando como guía las tiras de control REACTIVO FUERTE, de control REACTIVO DÉBIL o de ambos.
3. La interpretación posterior de la tira de análisis se basa en la detección de patrones específicos en las bandas según las recomendaciones de las autoridades pertinentes (Ministerio de Sanidad, Organización Mundial de la Salud, etc.).

Las directrices específicas para la interpretación pueden variar según los criterios locales. MPD recomienda seguir el criterio aceptado de conformidad con las normativas locales. En la tabla que aparece a continuación figuran algunas de las directrices recomendadas por diferentes organismos reguladores internacionales.

ORGANISMO REGULADOR	INTERPRETACIÓN DE LOS CRITERIOS
Centers for Disease Control (CDC)/ASTPHLD	Al menos una banda de ENV (gp41 y gp120/160) y p24
Food and Drug (FDA) Administration de EE. UU.	p24 y p31 y gp41 o gp120/gp160
Centre Nationale de Transfusion Sanguine	Dos bandas de ENV con GAG o POL
Organización Mundial de la Salud (WHO)	Dos bandas de ENV con o sin GAG o POL
Consorcio para la normalización de las serologías de retrovirus (CRSS)	Una banda de p24 o p31 y una banda de ENV
Cruz Roja Estadounidense	Una banda de GAG, otra de POL y otra de ENV
Asociación alemana para el control de as enfermedades víricas (DVV)	Una banda de ENV y al menos una banda de GAG o de POL; véase también el DIN 58 969-41

Recomendamos las siguientes directrices para la interpretación del MPD HIV BLOT 2.2 de MPD. Deben registrarse los resultados de todas las bandas detectadas, e interpretarse como NEGATIVO, POSITIVO o DUDOSO.

PATRÓN	INTERPRETACIÓN
Ninguna banda vírica específica presente	NEGATIVO
Detección de anticuerpos p17 **ÚNICAMENTE**, sin ninguna otra banda	NEGATIVO
Detección de 2 ENV (gp160/gp41y gp120) y GAG (p17, p24, p55) **o** POL (p31, p51, p66)	VIH-1 POSITIVO
Detección de 2 ENV (gp160/gp41 y gp120) y GAG (p17, p24, p55) **o** POL (p31, p51, p66) y banda específica del VIH-2 visible	VIH-1 POSITIVO con VIH-2 SEÑALADO
Cualquier banda vírica específica presente, pero el patrón **no cumple** los criterios para POSITIVO	DUDOSO
Cualquier banda vírica específica presente, pero el patrón **no cumple** los criterios para POSITIVO con una banda específica del VIH-2 visible.	DUDOSO con VIH-2 SEÑALADO

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La detección de anticuerpos frente al VIH-1 no implica que se haya establecido un diagnóstico de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Una TRANSFERENCIA NEGATIVA no constituye una garantía de la ausencia del agente causal del SIDA. Aunque una transferencia POSITIVA para anticuerpos frente al VIH-1 indica infección por el virus, el diagnóstico clínico de SIDA sólo se puede establecer si la persona cumple los criterios definitorios de SIDA establecidos por los *Centers for Disease Control* de EE. UU., la Organización Mundial de la Salud u otra autoridad competente.

Es un hecho conocido que las personas que han experimentado una seroconversión reciente pueden presentar un patrón incompleto, pero se produce un aumento de la reactividad (tanto en el número como en la intensidad de las bandas) si se hace un seguimiento durante un periodo de dos a seis meses. La mayoría de las transferencias con resultados POSITIVOS presenta otras bandas víricas específicas.

Las transferencias DUDOSAS no deben utilizarse como base para el diagnóstico de infección por VIH-1. Se recomienda repetir todas las transferencias con resultado DUDOSO utilizando la muestra original y muestras seriadas. En los donantes de sangre con transferencias DUDOSAS debe repetirse el análisis con una muestra nueva al cabo de dos a seis meses. Es también sabido que los anticuerpos frente a p24 y a p31 disminuyen durante el curso del SIDA, lo que provoca un desplazamiento de la interpretación de la transferencia de POSITIVA a DUDOSA. Por consiguiente, en tales circunstancias, la interpretación de los resultados debe basarse en las transferencias posteriores y en las evaluaciones clínicas.

Dada su elevada especificidad, la AUSENCIA DE REACTIVIDAD de las muestras con el péptido específico de la envoltura del VIH-2 en una transferencia vírica dudosa no excluye la posibilidad de infección con otras cepas del VIH-2.

Las muestras señaladas como infección por VIH-2 deben volverse a analizar con un kit de Western blot para VIH-2.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

Se evaluó mediante estudios clínicos el rendimiento del ensayo HIV BLOT 2.2 de MPD para la detección de anticuerpos frente al VIH-1 y el VIH-2 .

Tabla 1: Estudio de sensibilidad de la reactividad del antígeno vírico del VIH-1 en muestras seropositivas para el VIH-1 (Número de muestras = 197)

PERFIL SEROLÓGICO	HIV BLOT 2.2 NÚMERO (%)	HIV-1 WB de DUPONT/ORTHO NÚMERO (%)
GAG, POL y ENV	192 (97,5%)	188 (95,4%)
p24, p31, gp41 y/o gp120/gp160	187 (94,9%)	179 (90,9%)
ENV y GAG o POL	197 (100,0%)	197 (100,0%)

Tabla 2: Estudio de especificidad de la reactividad del antígeno vírico del VIH-1 en muestras de donante sano y suero con otras infecciones víricas

TIPO DE MUESTRA	NÚMERO	POSITIVO	REACTIVIDAD al VIH-1	
			DUDOSO*	NEGATIVO
Donantes sanos	208	0	11	197
HTLV-1	5	0	0	5
CMV	5	0	1	4
VEB (IgM)	5	0	1	4
V. zóster (IgG)	5	0	1	4
Sarampión	6	0	2	4
Rubéola	5	0	1	4
Paperas	4	0	1	3
Adenovirus	5	0	2	3
HSV	5	0	0	5
Dengue	5	0	1	4
Total	**258**	**0**	**21**	**237**

* Todos visibles como una banda de p24 o p17 únicamente.

Tabla 3: Estudio de sensibilidad de la banda del péptido del VIH-2 con muestras seropositivas para el VIH-2 (Número de muestras = 178)

Transferencia Western de VIH-2 Perfil serológico@	Reactividad al péptido del VIH-2	
	Positiva	Negativa
GAG, POL y 2 ENV	160	0
GAG, POL y 1 ENV	18	0

@Sueros clasificados como positivos por los resultados del ensayo Pasteur New LAV Blot 2. Datos aportados por el Dr. Oliviero E. Varnier y la Dra. Flavia Lillo. Laboratorio de retrovirus humanos. Universidad de Génova.

Tabla 4: Estudio de especificidad de la banda del péptido del VIH-2 con muestras seropositivas para el VIH-1, muestras de donantes sanos y suero con otras infecciones víricas

TIPO DE MUESTRA	NÚMERO	REACTIVIDAD al PÉPTIDO del VIH-2	
		POSITIVA	NEGATIVA
Seropositiva para VIH-1	197	16[a]	181
Donantes sanos	208	0	208
Seropositiva para HTLV-1	5	0	5
CMV	5	0	5
VEB (IgM)	5	0	5
V. zóster (IgG)	5	0	5
Sarampión	6	0	6
Rubéola	5	0	5
Paperas	4	0	4
Adenovirus	5	0	5
HSV	5	0	5
Dengue	5	0	5
Total	**455**	**16**	**439**

[a]Al analizarlas mediante Western Blot para HIV-2 de MPD, 6 de estas muestras presentaron reactividad con ENV y GAG o POL, otras 9 fueron reactivas sólo a GAG y/o POL y 1 muestra resultó negativa.

Se analizó con el ensayo HIV Blot 2.2 de MPD un total de 15 paneles de seroconversión para VIH-1 comercializados, y los resultados mostraron que el ensayo HIV Blot 2.2 de MPD logró detectar anticuerpos frente al VIH antes o en la misma muestra en todos los paneles.

CLÁUSULA DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

El fabricante garantiza exclusivamente que el kit de análisis funcionará como ensayo diagnóstico *in vitro*, de acuerdo con las especificaciones y limitaciones descritas en el Manual de instrucciones del producto, cuando se use de conformidad con las instrucciones citadas en el mismo. El fabricante rehusa cualquier garantía, explícita o implícita, incluida la garantía explícita o implícita relativa a la comercialización, adecuación para el uso o supuesta utilidad para cualquier fin. El fabricante sólo se obliga a la sustitución del producto o al reembolso del precio de compra del mismo. El fabricante no será responsable ante el comprador ni ante terceros, de cualesquiera daños, perjuicios o pérdidas económicas provocados por la utilización o la aplicación del producto.

PROBLEMAS TÉCNICOS Y RECLAMACIONES

En caso de problemas técnicos o si desea presentar una reclamación, proceda de la siguiente manera:

1. Anote el número de lote del kit y su fecha de caducidad y el número de lote de la tira.
2. Conserve los kits y los resultados obtenidos.
3. Póngase en contacto con la oficina de MP Biomedicals más cercana o con su distribuidor local.

BIBLIOGRAFÍA

1. V.C.W.Tsang, K. Hancock, M. Wilson. D.F. Palmer, S. Whaley, J.S. Mc Dougal, and S. Kennedy. Marzo de 1985. Developmental Procedure: Enzyme-linked Immunoelectro-transfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies; CDC, Atlanta.

2. H. Towbin, T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 76: 4350-4354.

3. J. Schupbach, M. Popovic, R. V. Gilden. M.A. Gonda, M. G. Sarngadharan and R. C. Gallo. 1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505.

4. M. G. Sarngadharan, M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach and R. C. Gallo. 1984. Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.

5. CDC. 1985. “Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome” - United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34 (1) :1-5.

6. WHO Collaborating Group on HIV-2 1990, WHO Weekly Epidem. Rec. 10, p74-75.

7. F. Clavel, D. Guetard., F. Brun-Vezinet, et al. 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346.

8. F. Clavel., 1987. HIV-2, the West African AIDS virus. AIDS 1:135-140.

9. R.S. Tedder, A. Hughes, T. Corrah et al. 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930.

10. Bottiger B., A. Karlsson, F. Andreasson et al. 1990. Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J. Virol. 64(7):3492-3499.



MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapore 118259
Tel.: + 65 6775 0008
Fax: + 65 6775 4536
Correo electrónico: enquiry_ap@mpbio.com



Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Alemania
Tel.: + 49 68 94 58 1020
Fax: + 49 68 94 58 1021
Correo electrónico: info@mt-procons.com

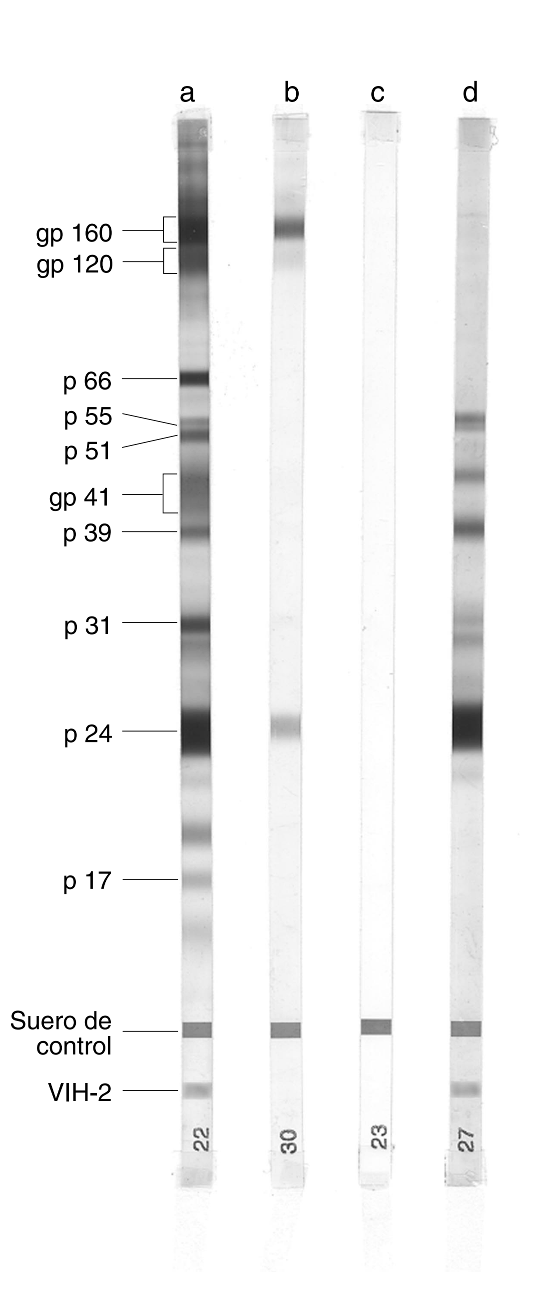
Oficinas regionales:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Ginebra 5
Suiza
Tel. : (4122) 788-1908
Fax : (4122) 788-1986
Correo electrónico: mpbiosuisse@mpbio.com

* Patente 5,721,095 de EE. UU.

* El nombre y el logotipo de Genelabs cuentan con licencia de Genelabs Technologies, Inc.

FIGURA 1



- a. Control reactivo fuerte (reactivo para el VIH-1 y el VIH-2)
- b. Control reactivo débil (reactivo sólo para el VIH-1)
- c. Control no reactivo
- d. Un ejemplo típico de suero positivo para el VIH-2

DIAGRAMA PARA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Aparecen puntos negros en las tiras

1. Contaminación bacteriana o micótica de la muestra del análisis.
2. Precipitación de complejos inmunes en muestras de análisis envejecidas.
3. Contaminación bacteriana o micótica en tiras por una conservación inadecuada.
4. Tiras físicamente dañadas, agrietadas o rayadas.
5. No se han lavado adecuadamente las tiras entre los distintos pasos del ensayo.

Manchas blancas en las tiras

1. Se ha dado la vuelta a las tiras durante el ensayo.
2. Las bandejas no se han lavado adecuadamente antes de su utilización.
3. Disolución deficiente del polvo de transferencia.
4. Interferencia en la electrotransferencia durante su fabricación.

No aparecen las bandas esperadas o muestran una intensidad débil.

Comprobar control positivo

Control positivo débil

Puede que el problema esté provocado por los reactivos.

1. Los reactivos no están preparados adecuadamente.
2. Dilución errónea del conjugado.
3. Reactivos inestables por exposición a temperatura inadecuada.
4. Conjugado contaminado con IgG humana.
5. pH del sustrato incorrecto por exposición a una intensa luz ultravioleta o a un agente reductor.
6. Alta concentración de fosfato en bandejas, reactivos o agua.
7. Se ha utilizado un plato rotativo en lugar de un plato basculante.

Control positivo OK

Puede que el problema esté provocado por la muestra del análisis.

1. Dilución errónea de la muestra del análisis.
2. Muestra del análisis contaminada con el conjugado.
3. Las muestras del análisis muestran fuertes complejos inmunes.
4. La IgG de la muestra del análisis está deteriorada o desnaturalizada por ciclos repetidos de congelación o por una conservación inadecuada.
5. Se ha utilizado un agitador rotativo en lugar de un plato basculante.
6. La muestra del análisis puede ser un "falso" positivo de ELISA.

Aparecen bandas no específicas y no indican VIH-2

1. La muestra es muy fuerte y reacciona con pequeñas cantidades de intermediarios.
2. Las muestras reaccionan de forma cruzada con proteínas H-9 presentes en la preparación viral (por ejemplo HLA, ABC, DR)
3. Se han identificado bandas legítimas (antígeno de envoltura desglicosilado) de alrededor de 80 y 90 kD en algunas muestras de análisis.

Aparece un fondo fuerte en la tira con ausencia o presencia de bandas positivas.

1. Tiras sobrerreveladas (parar reacción antes).
2. Lavado incompleto.

Ausencia de banda del control de suero

1. No se añadió suero.
2. Se ha dado la vuelta a las tiras durante el ensayo.
3. No se añadió e conjugado.
4. No se añadió el sustrato.

Aparecen bandas que no son las del control de suero en controles negativos

Los pocillos de la bandeja o el control han podido sufrir una contaminación cruzada.

Aparecen bandas no específicas o fondos oscuros en las tiras

1. Dilución errónea de la muestra del análisis o del conjugado.
2. Incubación demasiado larga de la muestra del análisis o del reactivo.
3. Lavado incompleto durante el ensayo.
4. Temperatura de incubación superior a 30 °C.
5. Reacción de la muestra del análisis con proteínas no víricas.

Las tiras están defectuosas

1. Están agrietadas.
2. Contienen burbujas de aire que provocan la aparición de puntos blancos en zonas de reacción lo bastante grandes como para evitar la detección.
3. Muestran puntos negros debido al crecimiento micótico que se originó a partir de la apertura inicial de los tubos de las tiras. Sin embargo, si los puntos negros aparecen un tiempo después de la apertura inicial del tubo, este problema es debido a unas condiciones inadecuadas de conservación de la tira en el emplazamiento del usuario.

Banda nítida y discreta en la región de la gp41

1. No es la banda gp41, ya que la gp41 es una banda difusa.
2. No interpretar como gp41.
3. Posiblemente se trate de una proteína de línea celular, p42.

Marcas de agua en las tiras reveladas

1. Las tiras se dejaron secar después del paso de pre-empapado antes de añadir el tampón de transferencia.